

USO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NA MEDICINA VETERINÁRIA

GOMES, Débora Senise¹; TIRONI, Stella Maris Teobaldo²; MARTINEZ, Antonio Campanha³

¹ Aluna do Programa de Pós Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal – UEM, Campus Umuarama, PR. Email: debsenise@gmail.com

² Mestranda do Programa de Pós Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal – UEM, Campus Umuarama, PR. Email: smttironi@hotmail.com

³ Professor Adjunto da Universidade Estadual do Paraná (UEM), Campus de Umuarama, PR. Email: acmartinez@uem.br

Palavras-chave: amostras, aplicação, avaliação, microscópio, utilização.

Introdução

O termo microscópio é derivado da palavra em latim *micro*, que significa pequeno, e da palavra grega *skopos*, que significa olhar. Ou seja, a função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano os micro-organismos que são muito pequenos para tal (KESTENBACK, 1994).

A microscopia iniciou-se com uma pequena lente, similar a uma lupa, e posteriormente foi substituída pelo microscópio óptico, que utiliza a luz para observar as amostras. Sua resolução se mostra limitada devido ao comprimento de onda da radiação incidente, surgindo a necessidade de corrigir este problema surge a microscopia eletrônica (KESTENBACK, 1994).

Após a descoberta da ótica geométrica, por Busch em 1926, e da ótica eletrônica de ondas, por French, surge o primeiro microscópio eletrônico de transmissão, descrito por Max Knoll e Ernst Ruskar em 1931, e em 1935 é construído o primeiro microscópio eletrônico de varredura (BOGNER et al., 2007).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite observar e caracterizar microestruturas internas de materiais com alta resolução, já a microscopia eletrônica de varredura (MEV) apesar de assemelhar-se ao MET é aplicada a observar a superfície das amostras, ou seja, sua principal aplicação baseia-se na análise topográfica das superfícies (HINKS, 2009).

O microscópio eletrônico de varredura possui uma grande profundidade de foco, atingindo 3 nm de resolução (300 vezes maior que o microscópio óptico), consiste em uma sonda de elétrons que é focada sobre a amostra, fazendo uma varredura em linhas paralelas (BOGNER et al., 2007).

As principais vantagens no seu uso incluem a fácil preparação da amostra, ampla variedade de magnitude, alta profundidade de campo e fácil interpretação das micrografias que são geradas e a diversidade do tipo de informação. Já as desvantagens estão na dificuldade de examinar amostras isoladas e a impossibilidade em examinar amostras hidratadas (JAMES, 2009).

A MEV tem evoluído e além de apresentar informações estruturais, tem apresentado informações analíticas das amostras. Há vários modelos e aplicações, através do MEV com detector de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) com raios X, microanálise de raios X, pode-se além de gerar imagens, determinar a composição química da amostra (RAMOS, 2013).

Esta microanálise de raio X permite a análise qualitativa e quantitativa, permitindo mensurar os elementos de interesse, como por exemplo, detectar o elemento e determinar sua localização na amostra estudada, utilizada principalmente por pesquisadores das áreas de engenharia, química e afins (RAMOS, 2013).

Paralelamente ao desenvolvimento da microscopia eletrônica é importante destacar o desenvolvimento de computadores, softwares e imagens digitais que facilitou a análise e a publicação dos achados do microscópio (DEDAVID et al., 2007)

Através da necessidade dos pesquisadores em conhecer as vantagens de cada tipo de microscópio para análises biológicas, este estudo busca através de uma revisão bibliográfica, de caráter exploratório-descritivo e de metodologia qualitativa, o objetivo de demonstrar a importância da microscopia eletrônica de varredura e suas aplicações.

Desenvolvimento

Princípios de Funcionamento

Segundo Dedavid et al (2007), os componentes do MEV são: canhão eletrônico, coluna composta por uma série de lentes eletrônicas, uma câmara para amostras, detectores e sistema de vácuo.

Utiliza-se um feixe de elétrons, que explora a superfície da amostra de ponto a ponto, fazendo uma varredura, através de uma bobina de deflexão o feixe pode ser guiado e o sinal da imagem resulta da interação deste feixe com a superfície da amostra. O detector é quem recebe o sinal e o modula, permitindo a observação, conforme observa-se na Figura 1 (DEDAVID et al., 2007).

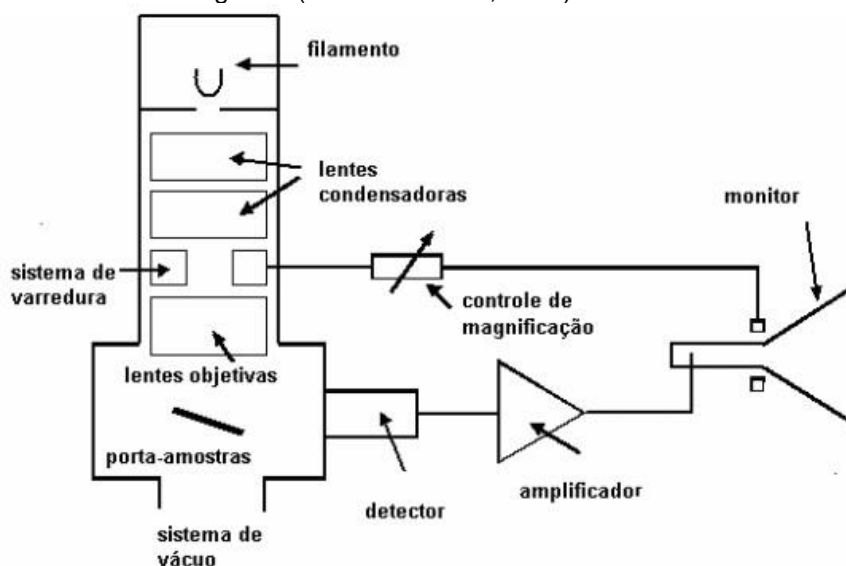


Figura 1. Esquema dos componentes básicos da MEV (DEDAVID et al, 2007).

A maioria dos equipamentos utiliza como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando em uma faixa de 1 a 50 kV de aceleração, o feixe é acelerado através da tensão entre o filamento e o ânodo, em seguida ele é focalizado por uma série de três lentes eletromagnéticas com diâmetro menor que 4 mm (DEDAVID et al., 2007). A câmara de amostra é dotada de controles para mover o material em exame e localiza-se na base da coluna (GRIMSTONE, 1980)

Então os detectores coletam as diferentes interações entre o feixe primário e a amostra, resultando em elétrons secundários ou retroespalhados, que originam os principais sinais utilizados na obtenção da imagem (DEDAVID et al., 2007).

A interação entre o feixe eletrônico e a amostra resulta em vários efeitos, na técnica de energia dispersiva (EDS) pode-se obter informações sobre a estrutura ou composição da amostra através da emissão de raios-x de comprimento de onda característicos. Estes raios-x podem ser coletados através de um detector específico (GRIMSTONE, 1980)

Para amostras bem preparadas pode-se utilizar uma aceleração de 20 a 25 kV, pois ganha-se na resolução, já para amostras mais sensíveis é aconselhado baixar a aceleração para 5 kV. A escolha da distância entre o topo da amostra e o local da saída do feixe de elétrons deve ser baseada na ideia que pequenas distâncias favorecem a resolução de foco, já as distâncias maiores garantem profundidade do foco em amostras de grande volume (SILVEIRA, 1998).

Preparação das amostras

As amostras podem ser de origem biológicas ou não biológicas. As biológicas são por sua natureza hidratadas, necessitando de algumas etapas para posterior observação no MEV. Apenas alguns materiais resistentes e com baixo teor de água como semente, espículas, cutículas de insetos podem ser observadas com uma preparação mínima. Em geral as amostras passam por um processo de desidratação que vai depender da sua natureza (GRIMSTONE, 1980).

As amostras devem ser representativas e as etapas se dividem em coleta, seleção, limpeza, estabilização da forma (fixação) e desidratação com acetona ou etanol (SILVEIRA, 1998).

Os materiais, após estas etapas, passam pelo processo de secagem ao ponto crítico do CO₂, onde este na forma líquida é lentamente aquecida e passa imperceptivelmente da fase líquida para a gasosa, a expansão deste gás dentro da câmara faz a pressão subir acima da pressão crítica de CO₂ (73 atm), mantendo a temperatura da câmara acima de 31^o C (onde não há risco de liquefação do gás) (DEDAVID et al., 2007).

Nesta transição de fase gradual, a densidade da fase líquida se mantém igual da fase gasosa, portanto a tensão superficial é zero, a amostra é removida seca da câmara sem alteração a sua forma (DEDAVID et al., 2007).

Estando o material seco, ele deve ser montado em uma câmara de amostras (porta-amostras), vários tipos de adesivos podem ser usados, sendo a fita de carbono a mais indicada por ser condutora e auxiliar no escoamento de elétrons. E por fim independente do método utilizado toda amostra não condutível passa por uma etapa de metalização onde utiliza-se ouro ou carbono para recobrimento da amostra, onde as camadas depositadas podem melhorar a emissão de elétrons, melhorando a chance de obtenção de imagens satisfatórias (GRIMSTONE, 1980).

As amostras devem preferencialmente ser fotografadas imediatamente após a preparação, podendo ser conservada em um dissecador com sílica-gel, se necessário. Para observação, como a maioria das amostras são biológicas, elas precisam de baixa aceleração, para que haja melhor informação topográfica da superfície. Para assegurar melhor imagem, as lentes devem estar em um correto alinhamento com o canhão para o ajuste do foco, e também deve ser usado um filme de boa qualidade e estar atento as condições do registro como: brilho, contraste e velocidade da varredura. (DEDAVID et al., 2007).

Aplicação para utilização do MEV

O MEV é um aparelho auxiliar, que pode revelar informações rapidamente sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de amostras sólidas. Por esse motivo, é grande a sua utilização em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia (DEDAVID, 2007).

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) revela uma riqueza de detalhes, sendo assim, tem sido possível que taxonomistas identifiquem espécies, pois encontram informações detalhadas e importantes para a classificação das mesmas (GRIMSTONE, 1980).

A principal razão da utilização da microscopia eletrônica de varredura, é sua ótima resolução alcançando valores da ordem de 2 a 5 nanômetros, tornando-se assim, uma ferramenta bastante importante em atividades de pesquisas, pois sem ajuda destes aparelhos, o olho humano tem um poder de resolução de 1/10 milímetro, ou 100 micrômetros. Amostras utilizadas em pesquisas, podem alcançar uma resolução melhor ainda, de até 1 nanômetro. (NAGATANI, 1987).

Atualmente o microscópio eletrônico de varredura é o instrumento mais versátil usado para avaliação, exame topográfico e análise das características microestruturais de amostras tanto biológicas como não-biológicas (CASTRO, 2001).

Sendo assim, as principais aplicações do MEV são com objetivo de avaliar detalhes estruturais finos, objetos pequenos e tridimensionais. Portanto, o microscópio também vem sendo usado em análises de objetivos como grãos de pólen, esporos de fungos, superfícies de folhas, ornamentação superficial de sementes de frutos, cutículas e ovos de insetos, e pequenos fósseis (GRIMSTONE, 1980).

Somente estruturas superficiais podem ser examinadas com o MEV. E além destes exames, as aplicações do microscópio eletrônico de varredura (MEV) incluem desde estudo de organismos inteiros, tecidos e órgãos, até em certos casos, visualização in situ de organelas subcelulares. Conseqüentemente, este é utilizado para estudar células inteiras, tecidos e superfícies de diversas estruturas (CASTRO, 2001).

Para os paleontólogos, a utilização da microscopia eletrônica de varredura, tem permitido e contribuído com a distinção de fósseis, através de dados obtidos com fins estratigráficos. Sendo assim, em qualquer área de pesquisa, a MEV terá grande valor em detalhes, quando se fizerem necessários conhecimentos de topografias superficiais (GRIMSTONE, 1980).

Além desses materiais, fungos fitopatogênicos podem ser avaliados com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura, esporos de ferrugem, ramos, folhas ou frutos que apresentem lesões ocasionadas pelo fungo (CASTRO, 2001).

Tecidos animais ou vegetais, que apresentem infecção externa por bactérias, são geralmente preparados, como para observação de qualquer estrutura externa. Visualização de estruturas de artrópodes e vermes, como nematódeos. Mucosas animais, análise de dentes e cabelos também são materiais que podem ser observados pela MEV, desde que haja uma prévia preparação dos materiais, como por exemplo a remoção de detritos, sangue ou muco (CASTRO, 2001).

Conclusão

O microscópio eletrônico de varredura possui uma grande profundidade de foco, atingindo resolução 300 vezes maior que o microscópio óptico. O MEV utiliza um feixe de elétrons, que explora a superfície da amostra de ponto a ponto, resultando em uma imagem a partir da interação deste feixe com a superfície da amostra.

As amostras devem ser representativas e as etapas se dividem em coleta, seleção, limpeza, estabilização da forma (fixação) e desidratação com acetona ou etanol.

As principais vantagens no seu uso incluem a fácil preparação da amostra, ampla variedade de magnitude, alta profundidade de campo e fácil interpretação das micrografias que são geradas e a diversidade do tipo de informação.

Em suma, o microscópio eletrônico de varredura (MEV) revela uma riqueza de detalhes, podendo ser utilizado em uma infinidade de amostras, como: identificação de espécies, morfologia e identificação de elementos químicos, grãos de pólen, esporos de fungos, superfícies de folhas, sementes de frutos, cutículas e ovos de insetos, pequenos fósseis, organismos inteiros, tecidos e órgãos, organelas subcelulares, distinção de fósseis, fungos fitopatogênicos, esporos de ferrugem, ramos, folhas ou frutos, tecidos animais ou vegetais, que apresentem infecção externa por bactérias, mucosas e até mesmo, dentes e cabelos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOGNER, A. et al. A history of scanning electron microscopy developments: towards “wet-stem” imaging. *Micron*, New York, v. 38, n. 4, p. 390-401. July, 2007.

CASTRO, L. A. S. **Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura**. Luis Antônio Suíta de Castro. - Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G.. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

GRIMSTONE, A.V. **O Microscópio Eletrônico em Biologia**. Editora Pedagógica e Universidade Ltda; Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 1980.



II Simpósio

Produção Sustentável e Saúde Animal

“A INTEGRAÇÃO DA PÓS GRADUAÇÃO”

25 a 27 de Maio, 2017

- HINKS, J.A. A review of transmission electron microscopes with in situ ion irradiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**. Amsterdam, v. 267, n. 23/24, p. 3652-3662. December, 2009.
- JAMES, B. Advances in “wet” electron microscopy techniques and their application to the study of food structure. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.20, p. 114-124. April, 2009.
- KESTENBACH, H.J.; BOTA FILHO, W.J. Microscopia Eletrônica de transmissão e varredura. São Paulo: **ABM**, 1994.
- NAGATANI, T.; SAITO, S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**, v.11, 901-909, 1987.
- RAMOS, T.M. **Tipos de pasteurização e agentes coagulantes na fabricação do queijo tipo prato**. 2013.
- SILVEIRA, M. Preparo de Amostras Biológicas para a Microscopia Eletrônica de Varredura. In: SOUZA, W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas. Rio de Janeiro: **Sociedade Brasileira de Microscopia**, 1998, p. 33-44.